

PCT/PTO

02 FEB 2001

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-321198

(43)Date of publication of application : 20.11.2001

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68  
C12N 15/09  
G01N 21/78  
G01N 27/06  
G01N 27/327  
G01N 33/53  
G01N 33/532  
G01N 33/566  
G01N 33/58  
G01N 37/00  
// C12M 1/00

(21)Application number : 2001-065472

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 08.03.2001

(72)Inventor : MAKINO YOSHIHIKO  
ABE YOSHIHIKO  
OGAWA MASASHI  
TAKAGI MAKOTO  
TAKENAKA SHIGEORI  
YAMASHITA KENICHI

(30)Priority

Priority number : 2000063129

Priority date : 08.03.2000

Priority country : JP

## (54) METHOD FOR ASSAYING COMPLEMENTARITY OF SAMPLE NUCLEIC ACID FRAGMENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for conveniently assaying the complementarity of a sample nucleic acid fragment to a probe molecule.

SOLUTION: This method comprises a process for acting a sample nucleic acid complex obtained by inserting and fixing a marker-bearing intercalator to a double strand structure formed through hybridization by contacting the solid phase carrier probe molecule with the sample nucleic acid fragment in the presence of a water system medium on the water system medium, a process for giving a physical or chemical environmental change to the water system medium under contacting with the sample nucleic acid complex and detecting the elimination of the sample nucleic acid fragment from the sample nucleic acid complex caused by the environmental change by means of measuring the decrease in the amount of the marker on the solid phase carrier caused by the elimination of the intercalator caused in parallel with the elimination of the sample nucleic acid fragment to obtain the data on the stability of the sample nucleic acid fragment contained in the complex, and a process for comparing the data (it is separately prepared) showing the stability of the referred nucleic acid complex which comprises the referred nucleic acid fragment showing confirmed complementarity to the above probe molecule, the above marker-bearing intercalator and the probe molecule to the environmental change used in the above process with the data on the stability obtained by the above process.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-321198

(P2001-321198A)

(43) 公開日 平成13年11月20日 (2001. 11. 20)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード <sup>*</sup> (参考)	
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 N	15/09	G 0 1 N	21/78	C
G 0 1 N	21/78		27/06	Z
	27/06		33/53	M
	27/327		33/532	A
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 17 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願2001-65472(P2001-65472)

(22) 出願日 平成13年3月8日 (2001. 3. 8)

(31) 優先権主張番号 特願2000-63129(P2000-63129)

(32) 優先日 平成12年3月8日 (2000. 3. 8)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 牧野 快彦

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ

イルム株式会社内

(72) 発明者 阿部 義彦

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ

イルム株式会社内

(74) 代理人 100074675

弁理士 柳川 泰男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料核酸断片の相補性の検定方法

## (57) 【要約】

【課題】 プローブ分子に対する試料核酸断片の相補性を簡便に検定する方法を提供すること。

【解決手段】 固相担体のプローブ分子と、試料核酸断片との水系媒体の存在下での接触により、ハイブリダイゼーションを介して形成された二本鎖構造体に、標識付きインターカレータが挿入固定された試料核酸複合体を水系媒体に接触させる工程；試料核酸複合体と接触下の水系媒体に物理的又は化学的な環境変化を与え、該環境変化により発生する試料核酸複合体からの試料核酸断片の脱離を、該脱離に併行するインターカレータの脱離により発生する固相担体上の標識量の減少を測定することによって検知して、試料核酸断片の複合体中における安定性のデータを得る工程；そして、前記プローブ分子に対する相補性が確認されている参照核酸断片、前記標識付きインターカレータ、そして該プローブ分子からなる参照核酸複合体の、上記工程で用いた環境変化に対する安定性を示すデータ（別に用意）と、上記工程で得られた安定性データとを比較する工程。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プローブ分子に対する試料核酸断片の相補性を検定するための、下記の工程を含む方法：

(1 a) 固相担体に固定された核酸もしくは核酸誘導体からなるプローブ分子と、試料核酸断片との水系媒体の存在下での接触により、ハイブリダイゼーションを介して形成された二本鎖構造体に、標識付きインターカレタが挿入固定されてなる試料核酸複合体を水系媒体に接触させる工程；

(2 a) 試料核酸複合体と接触下にある上記水系媒体に物理的もしくは化学的な環境変化を付与し、その環境変化に起因して発生する該試料核酸複合体からの試料核酸断片の脱離を、該脱離に併行する標識付きインターカレタの脱離により発生する固相担体上の標識量の減少を測定することによって検知して、試料核酸断片の試料核酸複合体中における安定性のデータを得る工程；そして  
(3 a) 別に用意した、前記のプローブ分子に対する相補性が確認されている参照核酸断片、前記の標識付きインターカレタ、そして該プローブ分子からなる参照核酸複合体の、上記工程 (2 a) で用いた環境変化に対する安定性を示すデータと、上記工程 (2 a) で得られた安定性データとを比較する工程。

【請求項 2】 上記工程 (2 a) における環境変化が、水系媒体の温度の変化である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 上記工程 (2 a) における環境変化が、水系媒体に付与される電気泳動的電位の変化である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 上記工程 (2 a) における環境変化が、水系媒体中のイオン強度の変化である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 上記標識インターカレタが導電性インターカレタである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 上記標識インターカレタが蛍光インターカレタである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 プローブ分子が三個以上の塩基からなる既知の塩基配列領域を有する分子である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 参照核酸断片が、上記塩基配列領域に対して完全な相補性を示す塩基配列領域を有する核酸断片である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 上記工程 (3 a) で用いる安定性データが、試料核酸断片の代わりに該参照核酸断片を用いる以外は上記工程 (1 a) と同じ操作を行なう工程により得られたものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】 プローブ分子が、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドもしくはペプチド核酸である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】 プローブ分子に対する試料核酸断片の相補性を検定するための、下記の工程を含む方法：

(1 b) 固相担体に固定された核酸もしくは核酸誘導体

からなるプローブ分子を、水系媒体と標識付きインターカレタとの存在下にて試料核酸断片と接触させることにより、ハイブリダイゼーションを介して、標識付きインターカレタが挿入固定された試料核酸複合体を生成させるに際して、該水系媒体に物理的もしくは化学的な環境変化を付与し、その環境変化に応じて生成する試料核酸複合体の量を、該試料核酸複合体の生成と併行する標識付きインターカレタの固相担体上への固定により発生する固相担体上の標識量の増加を測定することによって検知して、該試料核酸断片の該試料核酸複合体中における安定性のデータを得る工程；そして (2 b) 別に用意した、前記のプローブ分子に対する相補性が確認されている参照核酸断片、前記の標識付きインターカレタ、そして該プローブ分子からなる参照核酸複合体の、上記工程 (1 b) で用いた環境変化に対する安定性を示すデータと、上記工程 (1 b) で得られた安定性データとを比較する工程。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子診断分野の研究において、特に、塩基配列や塩基の種類が既知である異常遺伝子を保有する患者を対象とする遺伝子診断の一次スクリーニングのために有用な試料核酸断片の相補性の検定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 一般的に病気は、遺伝性素因に環境因子が作用して発症すると考えられているが、遺伝子技術の進展に伴って多くの疾患が、遺伝性あるいは外因性の遺伝子異常（塩基置換、塩基欠損、塩基挿入、塩基点変異、塩基転移等）を伴うことが明らかとなっている。即ち、これらの遺伝子異常が生じると、生成されるタンパク質の特性、種類および量が変わり、結果として生体システムのバランスが崩れて、疾患を引き起こすこととなる。従って、病因となる既知の遺伝子を検出することによって、疾患の同定や予防が可能となる。このような遺伝子そのものに基づく診断は、近年の遺伝子工学の進歩によって可能となったもので、遺伝子診断と呼ばれている。遺伝子診断の対象は、生殖細胞の遺伝子に異常がある遺伝性疾患のみではなく、外界からの作用によって体細胞の遺伝子内に生じた異常により引き起こされる疾患も含む。

【0003】 遺伝子診断の研究の方向としては、一つは、未知の異常遺伝子の探究・同定がある。ポジショナルクローニング（患者の家族の DNA を抽出し、異常の程度を連鎖解析によって調べることで、変異遺伝子の染色体上の座位を決定する方法）が確立されたため、現在では、病因遺伝子の確実な同定が可能となり、家族歴の明らかな遺伝性疾患のみでなく、これまで遺伝よりも環境因子の作用する割合が多いと考えられていた疾患（糖尿病、高血圧症等）の遺伝子診断も可能となっている。

もう一つは、既知となった異常遺伝子を有する多数の患者を対象とした迅速・正確な診断法の開発である。遺伝病としては、現在2000種類以上のものが知られているが、その中でも、小児高尿酸血症、鎌状赤血球貧血症、フェニルケトン尿症等は代表的な疾患である。この種の疾患に対して、新生児や胎児を対象とするマススクリーニング法が確立され、早期発見の実が上がっているが、将来的な遺伝子治療に向かって有効な診断法の開発は重要である。

【0004】遺伝子診断法としては、遺伝子断片の変異を検出するSSCP (single-stranded conformation polymorphism: 一本鎖DNA高次構造多型) 法をはじめとした種々の変異解析法が知られている。SSCP法は、一本鎖の正常遺伝子断片および一本鎖の異常遺伝子断片をポリアクリルアミドゲル中で電気泳動に付し、それぞれの遺伝子断片が示す、塩基配列に依存した高次構造の相違による移動度を検出することによって、遺伝子の微妙な変化を検出する方法である。しかし、SSCP法では、一本鎖DNA断片の塩基の変化が、必ずしもその移動度の変化と結びつかないことがある。特に塩基の変化がDNA断片の末端付近で起きている場合には、そのDNA断片の高次構造の変化が少ないため、塩基の変化を伴わないDNA断片の移動度と、何れかの塩基の変化を伴うDNA断片の移動度との差が極めて小さくなる結果、これら二つのDNA断片の識別が困難であるという問題がある。

【0005】SSCP法以外の方法としては、遺伝子の変化を、一本鎖の正常遺伝子断片と一本鎖の異常遺伝子断片とのハイブリダイゼーションにより得られる特殊DNA構造を持つ二本鎖DNA断片を検出することによって確認する方法がいくつか知られている。ここで、特殊DNA構造とは、正常のDNA構造が「フルマッチ構造」(完全な二本鎖を形成している構造)をいうのに対し、「ミスマッチ構造」(正常遺伝子断片と異常遺伝子断片とが、一つ以上の非塩基対形成部分を除いて二本鎖を形成している構造、即ち、部分相補的な構造)を意味する。

【0006】特表平9-501561号公報には、このミスマッチ構造を有する二本鎖DNA断片を蛍光顕微鏡によって検出する方法が開示されている。しかし、この方法では検出技術に熟練を要し、さらに標識として用いるフルオレセイン等の蛍光物質の褪色が起り易いという問題点を有する。

【0007】一方、ミスマッチ構造を有する二本鎖DNA断片とフルマッチ構造を有する二本鎖DNA断片とを、温度勾配ゲル電気泳動によって、その二本鎖の安定性の相違から生ずる移動度の差異を利用して検出する方法が知られている。

【0008】また、ミスマッチ構造を有する二種類の二本鎖DNA断片を、DNA断片に直接標識するDNAブ

ローブ法を利用して、ハイブリダイゼーションの条件を設定することにより検出する方法も知られている。図1に、フルマッチ構造を形成し得るDNA断片がハイブリダイゼーションの条件f a 1によって、完全二本鎖の状態(a)あるいは一本鎖の状態(b)をとる様子、そして、ミスマッチ構造を形成し得るDNA断片が、該条件f a 1とは異なる条件f a 2によって、部分的二本鎖の状態(c)あるいは一本鎖の状態(d)をとる様子を示す。従って、図1に示すように、フルマッチ構造の場合には状態(a)となるように、そしてミスマッチ構造の場合には状態(d)となるように条件を設定することによって、それぞれの相違を判断することが可能となる。しかし、このような条件は、DNA断片の長さや配列によって異なるため、反応ごとに条件設定をすることが必要となり、実用上において困難があり、また、一つの基板上に互いに異なる多種類のDNA断片(プローブ分子)が固定されている場合には、すべてのDNA断片について最適な一つの条件を設定するのは事実上不可能である。よって、遺伝子のあらゆる変化を簡便かつ高感度に検出するには、ミスマッチ構造を有する二本鎖DNA断片を迅速かつ高感度に検出できることが求められる。

【0009】ところで、本発明者らは、既知のDNA断片と試料DNA断片とのハイブリダイゼーションによって形成された二本鎖DNA断片の構造によって、その二本鎖DNA断片への電気化学活性縫い込み型インターカレータの取り込み量が異なるという性質を利用して、試料DNA断片が既知のDNA断片に対して部分相補性のDNA断片であることを検出する方法を既に開発している(特願平11-159339号)。当該出願明細書では、この方法によって実際に、リボタンパクリパーゼ遺伝子異常断片を検出できることが示されている。上記の方法では、DNA断片の長さや塩基配列が異なる場合であっても、また一つの基板上に多種類のDNA断片が固定されている場合であっても、フルマッチの場合には状態(a)をとり、ミスマッチの場合には状態(c)をとるようなひとつの条件を設定することが可能である。即ち、前記プローブ法が二本鎖の状態および一本鎖状態の状態において異常遺伝子断片を検出するのに対して、当該方法は、二本鎖の状態において異常遺伝子断片を検出できる方法であるといえる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、試料核酸断片に含まれる塩基配列の相補性の検定に際して、核酸断片各々の塩基数や塩基配列に応じたハイブリダイゼーションの条件を設定することなく、一律の条件にて検定が可能な方法を提供することを、その課題とする。本発明は特に、部分相補的な二本鎖を形成する試料核酸断片について、一律の条件下での検定を可能にする方法を提供することを、その課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、プローブ分子に対する試料核酸断片の相補性を検定するための、下記の工程を含む方法にある。

(1 a) 固相担体に固定された核酸もしくは核酸誘導体からなるプローブ分子と、試料核酸断片との水系媒体の存在下での接触により、ハイブリダイゼーションを介して形成された二本鎖構造体に、標識付きインターカレタが挿入固定されてなる試料核酸複合体を水系媒体に接触させる工程；

(2 a) 試料核酸複合体と接触下にある上記水系媒体に物理的もしくは化学的な環境変化を付与し、その環境変化に起因して発生する該試料核酸複合体からの試料核酸断片の脱離を、該脱離に併行する標識付きインターカレタの脱離により発生する固相担体上の標識量の減少を測定することによって検知して、試料核酸断片の試料核酸複合体中における安定性のデータを得る工程；そして

(3 a) 別に用意した、前記のプローブ分子に対する相補性が確認されている参照核酸断片、前記の標識付きインターカレタ、そして該プローブ分子からなる参照核酸複合体の、上記工程(2 a)で用いた環境変化に対する安定性を示すデータと、上記工程(2 a)で得られた安定性データとを比較する工程。

【0012】本発明は、また、プローブ分子に対する試料核酸断片の相補性を検定するための、下記の工程を含む方法にもある。

(1 b) 固相担体に固定された核酸もしくは核酸誘導体からなるプローブ分子を、水系媒体と標識付きインターカレタとの存在下にて試料核酸断片と接触させることにより、ハイブリダイゼーションを介して、標識付きインターカレタが挿入固定された試料核酸複合体を生成させるに際して、該水系媒体に物理的もしくは化学的な環境変化を付与し、その環境変化に応じて生成する試料核酸複合体の量を、該試料核酸複合体の生成と併行する標識付きインターカレタの固相担体上への固定により発生する固相担体上の標識量の増加を測定することによって検知して、該試料核酸断片の該試料核酸複合体中における安定性のデータを得る工程；そして

(2 b) 別に用意した、前記のプローブ分子に対する相補性が確認されている参照核酸断片、前記の標識付きインターカレタ、そして該プローブ分子からなる参照核酸複合体の、上記工程(1 b)で用いた環境変化に対する安定性を示すデータと、上記工程(1 b)で得られた安定性データとを比較する工程。

【0013】上記の本発明の方法の代表的な態様は次の通りである。

(I) 基板の表面に、少なくとも三個の塩基単位からなる塩基配列を含む核酸断片が固定されてなる核酸チップの該表面に、該塩基配列に相補的な塩基配列を含む遊離核酸断片を、水系媒体と標識付きインターカレタの存在下にて接触させ、ハイブリダイゼーションを介して、

該遊離核酸断片を該固定核酸断片に結合させることにより得られた、該標識インターカレタが挿入されている二本鎖核酸固定チップの該二本鎖核酸部分を水系媒体に接触させて、上記遊離核酸断片と固定核酸断片との結合状態に影響を与える該水系媒体の因子を変化させ、かつ並行して該核酸チップに挿入されている標識インターカレタの脱離量を基板上の標識量の変化を測定することにより得られた、該遊離核酸断片と固定核酸断片との結合状態の変化と上記因子の変化との相関関係を示す標準脱離情報を用意し、上記核酸チップと実質的に同一の構成からなる核酸チップの表面に、試料核酸断片を、上記標準脱離情報の作成に際して採用された方法と実質的に同一の方法で接触させて、標識インターカレタが挿入されている二本鎖核酸固定チップを調製し、次いで、これを前記と実質的に同一の水系媒体に接触させて、前記因子を変化させることにより得られる、該試料核酸断片と固定核酸断片との結合状態の変化と該因子の変化との相関関係を、該核酸チップに挿入されている標識インターカレタの脱離量を基板上の標識量の変化を測定することにより得て、ここで得られた相関関係と前記標準脱離情報とを比較することを特徴とする、核酸チップの固定核酸断片の前記塩基配列に対する試料核酸断片に含まれる塩基配列の相補性を検定する方法。

【0014】(II) 基板の表面に、少なくとも三個の塩基単位からなる塩基配列を含む核酸断片が固定されてなる核酸チップの該表面に、該塩基配列に相補的な塩基配列を含む遊離核酸断片を、水系媒体と標識付きインターカレタの存在下にて接触させ、該遊離核酸断片と固定核酸断片との結合状態に影響を与える該水系媒体の因子を変化させ、かつ並行して該核酸チップに挿入される標識インターカレタの量を基板上の標識量の変化を測定することにより得られた、該遊離核酸断片がハイブリダイゼーションを介して該固定核酸断片に結合する挙動の変化と上記因子の変化との相関関係を示す標準結合情報を用意し、上記核酸チップと実質的に同一の構成からなる核酸チップの表面に、試料核酸断片を、上記標準脱離情報の作成に際して採用された方法と実質的に同一の方法で、水系媒体と標識付きインターカレタの存在下にて接触させて、上記因子を変化させ、かつ並行して該核酸チップに挿入される標識インターカレタの量を基板上の標識量の変化を測定することによって、該試料核酸断片がハイブリダイゼーションを介して該固定核酸断片に結合する挙動の変化と上記因子の変化との相関関係をj得て、ここで得られた相関関係と前記標準結合情報とを比較することを特徴とする、核酸チップの固定核酸断片の前記塩基配列に対する試料核酸断片に含まれる塩基配列の相補性を検定する方法。

【0015】本発明の、試料核酸断片の相補性(特に特定の塩基配列の相補性)を検定する方法の好ましい態様は以下の通りである。

1) 上記工程 (2 a) もしくは (1 b) における環境変化として、水系媒体の温度の変化を利用する。

2) 上記工程 (2 a) もしくは (1 b) における環境変化として、水系媒体に付与される電気泳動的電位の変化を利用する。

3) 上記工程 (2 a) もしくは (1 b) における環境変化として、水系媒体中のイオン強度の変化を利用する。

【0016】4) 標識インターカレタとして、導電性インターカレタを利用する。

5) 標識インターカレタとして、蛍光インターカレタを利用する。

6) プローブ分子として、三個以上の塩基からなる既知の塩基配列領域を有する分子を利用する。

7) 参照核酸断片として、上記塩基配列領域に対して完全な相補性を示す塩基配列領域を有する核酸断片を利用する。

8) 上記工程 (3 a) もしくは (2 b) で用いる安定性データとして、試料核酸断片の代わりに該参照核酸断片を用いる以外は上記工程 (1 a) もしくは (1 b) と同じ操作を行なう工程により得られたものを用いる。

9) プローブ分子として、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドもしくはペプチド核酸を用いる。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の試料核酸断片に含まれる相補性 (特に塩基配列の相補性) を検定する方法は、

(イ) 二本鎖核酸断片の結合状態 (即ち、ハイブリダイズ) に影響を与える、ハイブリダイゼーションを行う水系媒体に与える物理的もしくは化学的環境の因子を、二本鎖核酸断片が解離する方向へ変化させて、試料核酸断片の塩基配列の相補性を検出する方法;そして、(ロ) 該水系媒体の物理的もしくは化学的環境の因子を、一本鎖の核酸断片と一本鎖の試料核酸断片とがハイブリダイズして二本鎖核酸断片を形成する方向へ変化させて、試料核酸断片の塩基配列の相補性を検出する方法の両方法を含む。試料核酸断片の塩基配列の相補性には、完全な相補性のみならず、部分的な相補性をも含む。「部分的な相補性を有する試料核酸断片」とは、完全相補性二本鎖を形成する特定の核酸断片に対して、塩基配列について部分的に同一である核酸断片をいう。

【0018】図2には、上記方法 (イ) の代表的な模式図を示す。(A) は、後述する「標準離脱情報」(STD) [参照核酸複合体の安定性データに相当する] を得る工程を表わし、(B) は、試料核酸断片の「試料離脱情報」(SAM) [試料核酸複合体の安定性データに相当する] を得る工程を表わす。この方法 (イ) は、工程 (A)、工程 (B)、および工程 (C) [図示せず] よりなる。

【0019】工程 (A) では、まず、核酸チップ (A-1、基板 (11) の表面にプローブ分子 (21) が固定されたもの) の表面に、プローブ分子 (21) の塩基配

列に相補的な塩基配列を含む参照遊離核酸断片 (31) を、水系媒体と標識付きインターカレタ (41) との存在下にて接触させ、ハイブリダイゼーションを介して、プローブ分子 (21) に参照遊離核酸断片 (31) を結合させることによって、標識付きインターカレタ (41) が挿入された二本鎖核酸固定チップ (A-2) を得る。ここでは、参照遊離核酸断片 (31) は、プローブ分子 (21) と完全な相補性を有する核酸断片であるとする。次いで、この二本鎖核酸部分を水系媒体に接触させて、二本鎖の結合状態に影響を与える水系媒体の環境因子を変化させながら、チップ (A-2) に挿入された標識付きインターカレタ (41) の脱離量を測定することによって、結合状態の変化と水系媒体の因子との相関関係を得ることができる。チップ (A-3) およびチップ (A-4) は、それぞれ、チップ (A-2) に水系媒体の環境因子を変化させたときに順次得られる二本鎖の結合状態を表す。図2の工程 (A) では、水系媒体の環境因子を変化させた場合に、二本鎖が徐々に解離し始め、これに伴って標識付きインターカレタ (41) が脱離していく様子が示されている。

【0020】標識付きインターカレタ (41) の脱離量は、基板 (11) 上の標識量の変化を測定することによって検出することができる。工程 (A) および下記の工程 (B) では、二本鎖は、水系媒体の環境因子の変化と共に解離し始め、二本鎖が解離した一本鎖に対しては、標識付きインターカレタは一般的に取り込まれないことから、二本鎖の結合状態は、基板上の標識量によって検出することができるからである。

【0021】工程 (B) では、最初に、工程 (A) で用いた核酸チップと実質的に同一な核酸チップ (A-1) に、水系媒体と標識付きインターカレタの存在下にて、試料核酸断片 (32) を接触させ、同様にハイブリダイゼーションさせることにより、部分相補性を有する二本鎖核酸断片が基板に固定されたチップ (B-2) を得る。次いで、上記工程 (A) と同様に、水系媒体の環境因子を変化させると、例えば、二本鎖が完全に解離した状態 (B-3) となり、標識付きインターカレタはすべて核酸断片から脱離する。基板上の標識量の変化を測定することによって、結合状態の変化と水系媒体の環境因子との相関関係を得ることができる。

【0022】工程 (C) では、工程 (A) および工程 (B) でそれぞれ得られた標準離脱情報 (STD) と試料離脱情報 (SAM) とを比較することによって、試料核酸断片 (32) が参照遊離核酸断片 (31) と部分的に同一性を有する核酸断片であることを検出することができる。

【0023】参照遊離核酸断片 (31) として、塩基配列および塩基の種類が既知であり、固定核酸断片 (21) とは部分的な相補性を有する核酸断片を用いて、標準離脱情報 (STD) を得て、これを試料離脱情報 (S

AM)と比較して相補性の判定に利用することもできる。

【0024】本発明の試料核酸断片に含まれる塩基配列の相補性を検定する方法(ロ)は、水系媒体の環境因子を変化させることについては方法(イ)と同様であるが、工程(A)に対応する工程では、「標準結合情報」を得ることができ、工程(B)に対応する工程では、「試料結合情報」を得ることができる点で、方法(イ)とは異なる。

【0025】以下、方法(イ)について詳述する。

【0026】[核酸チップ] 核酸チップは、固相担体(基板もしくは他の形態の固体の担体)の表面に、少なくとも三個の塩基単位からなる塩基配列を含む核酸断片などのプローブ分子が固定されたチップであることが好ましい。

【0027】基板としては、電気絶縁性の疎水性担体、あるいは電気絶縁性の低親水性の担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。基板の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、繊維物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質などを挙げることができるが、各種ポリマー、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。基板の厚さは、特に限定されないが、板状である場合には、100乃至10000 $\mu$ mの範囲にあることが好ましい。

【0028】基板としては、電極、光ファイバー、フォトダイオード、サーミスタ、ISFET、MOSFET、圧電素子、表面弾性波素子なども好ましく用いることができる。例えば、電極の場合には、上記の導電性を持たない基板上に電極が配置されたものを用いることが好ましく、電極は、互いに接しないように、かつ規則的に配置されていることが好ましい。電極の材料としては、グラファイト、グラシーカーボン等の炭素電極、白金、金、パラジウム、ロジウム等の貴金属電極、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛などの酸化物電極、Si、Ge、ZnO、CdS等の半導体電極、チタンなどの電子伝導体を挙げることができるが、金もしくはグラシーカーボンを用いることが特に好ましい。これらの電子伝導体は、導電性高分子によって被覆されていても、単分子膜によって被覆されていてもよい。導電性を持たない基板に複数の電極が配置されたものとしては、導電性を持たない基板の表面を上記の電子伝導体で処理したものを用いることが好ましく、金で蒸着処理し

たものを用いることが特に好ましい。基板は、電子伝導体で表面処理をする前に、基板上に電荷を有する親水性の高分子物質からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって基板の凹凸を軽減することができる。また、基板によっては、その基板中に電荷を有する親水性の高分子物質を含ませることも可能であり、このような処理を施した基板も好ましく用いることができる。

【0029】導電性を持たない基板上に複数の電極が配置されたものとしては、文献(Sosnowski, R.G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1119-1123(1997))に記載の、核酸が未固定のシリコンチップも好ましく用いることができる。また、プリント配線基板のように、が基板上に印刷されてなるものであってもよい。

【0030】プローブ分子は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。さらに、塩基配列の分析の場合には、4<sup>n</sup>(nは、塩基の長さ)種のオリゴヌクレオチドを合成したものを使用することが好ましい。核酸断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましく、その塩基種も既知であることが好ましい。プローブ分子は、3乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

【0031】プローブ分子として、ペプチド核酸(PNA)を利用することもできる。

【0032】核酸断片などのオリゴヌクレオチド、ポリペプチド、そしてペプチド核酸によって代表されるプローブ分子(以下では、核酸断片を代表例として説明する)の固相担体への固定方法としては、公知の方法を用いることができる。核酸断片の基板への固定方法は、核酸断片の種類および基板の種類に応じて適当な方法を選択することができる(蛋白質・核酸・酵素, Vol. 43, No. 13, 2004-2011(1998))。例えば、核酸断片がcDNAやPCR産物の場合には、DNAの荷電を利用して、ポリリシン、ポリエチレンジイミン、ポリアルキルアミン等の陽イオンで表面処理した基板に静電結合させる方法を用いることができる。合成ヌクレオチドを固定する場合には、基板上で直接合成する方法、あるいは予め末端に共有結合のための官能基を導入したオリゴマーを合成し、

表面処理した基板に共有結合させる方法を用いることができる。官能基としては、アミノ基、アルデヒド基、メルカプト基、ビオチン等を挙げることができる。基板としてガラスやシリコンを用いる場合には、その表面処理には、公知のシランカップリング剤を用いることが好ましい。

【0033】核酸断片の固定は、核酸断片の水性液を基板上の領域に点着して行うことが好ましい。点着後、所定の温度でそのまま数時間放置すると核酸断片の一端が基板上の領域に固定される。点着の条件は、使用する基板の種類、大きさ等によって異なる。点着は、マニュアル操作によっても行うことができるが、汎用されているDNAチップ作製装置に装備されたスポッターを用いて行うことも好ましい。点着後は、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、未固定の核酸断片を洗浄して除去することが好ましい。

【0034】[水系媒体の環境変化] 水系媒体の環境の変化とは、核酸チップ上に固定された核酸断片と試料核酸断片とのハイブリダイズを水系媒体中で実施するが、二本鎖形成後に解離していく場合および固定核酸断片と試料核酸断片とが二本鎖を形成していく場合の両方を含めて、二本鎖の結合状態に影響を与える水系媒体の物理的もしくは化学的な環境因子の変化をいう。具体的には、温度の変化（温度上昇あるいは温度低下）、イオン強度の変化（イオン強度の上昇もしくは下降）、pH変化（pH値の上昇もしくは下降）、有機溶媒の添加、尿素の添加などを挙げることができる。特に、特定の塩基配列を有する二本鎖については、その融解温度（ $T_m$ ）が知られている。水系媒体としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等の一般的な緩衝液、これらの緩衝液に電解質を添加したもの、あるいはさらに、ジメチルスルホキシドのような二本鎖の結合状態に影響を与えない有機溶媒を添加したものをを用いることが好ましい。

【0035】水系媒体の環境因子の変化の範囲は、温度については、核酸断片の凝固や核酸断片の高次立体構造の変化から、4乃至100℃の範囲にあることが好ましく、5乃至45℃の範囲にあることがさらに好ましく、15乃至45℃の範囲にあることが特に好ましい。イオン強度については、緩衝液に添加する電解質（例えば、塩化カリウム）の濃度が0乃至2.0Mの範囲にあることが好ましく、0.1乃至0.9Mの範囲にあることがさらに好ましく、0.3乃至0.7Mの範囲にあることが特に好ましい。

【0036】水系媒体の環境因子の変化の別の例としては、核酸チップ上のプローブ分子の周囲の水系媒体に電気泳動的電位を付与し、これを変化させる方法を挙げることができる。すなわち、試料となる核酸断片はアニオン性を示す化合物であることから、これを電気的勾配のある環境下におくと、その電気的勾配に沿って、移動す

る力が働く。この核酸断片の移動は通常、プローブ分子、核酸断片そして標識付きインターカレータからなる核酸複合体からの核酸断片（試料核酸断片または参照核酸断片）の脱離を促進する。そして、核酸複合体中の結合力が強いフルマッチ構造の核酸複合体からの相補性の高い核酸断片の脱離に比べて、核酸複合体中の結合力が相対的に弱いミスマッチ構造の核酸複合体からの部分相補性の核酸断片の脱離は、電気的勾配の小さい段階（電気泳動的電位の弱い段階）で開始される。

【0037】従って、核酸チップの表面に形成された核酸複合体（試料核酸複合体もしくは参照核酸複合体）の周囲に電気的勾配（電気泳動的電位）を付与し、この電気的勾配を連続的にあるいは、間欠的に変化させ、同時に、その変化に応じた核酸チップ上の標識量の変化（減少）を測定することにより、核酸断片の脱離の進行状況を確認することができる。そして、参照核酸複合体からの参照核酸断片の脱離の進行状況を示す電気泳動的電位の変化と核酸チップ上の標識量の変化との関係と、試料核酸複合体からの試料核酸断片の脱離の進行状況を示すとを、電気泳動的電位の変化と核酸チップ上の標識量の変化との関係とを比較することによって、試料核酸断片の相補性を検定することができる。

【0038】核酸チップの周囲での電気的勾配の付与は、核酸複合体からの核酸断片の脱離のみではなく、核酸チップの表面で発生するプローブ分子と核酸断片との間でのハイブリダイゼーションのしやすさ（二本鎖構造体の形成の容易さ）にも当然影響する。従って、前記の水系媒体の環境変化と、核酸断片の標識インターカレータの存在下におけるプローブ分子とのハイブリダイゼーションの進行状況との関係を利用する前記（ロ）のような検定方法の実施に際しても、この電気的勾配（電気泳動的電位）の変化を利用することができる。

【0039】上記の核酸チップ附近での電気的勾配（電気泳動的電位）の変化は、例えば、導電性インターカレータを用いる電気化学的検出方法を実施する場合には、核酸チップの基板として用いられる電極と、その電極と水系媒体を介して接触するように用意されている対電極との間に電気的勾配を形成する方法を利用して実現することができる。また、蛍光インターカレータを用いる方法には、核酸チップの基板に一方の電極を付設し、そして同じ水系媒体中に対電極を接触させることによって、電気的勾配を形成することができる。また、核酸チップの基板（固相担体）とは独立に、核酸チップの周囲に一对の電極を配置して電気的勾配を形成することも可能である。

【0040】[検定対象の試料核酸断片] 検定対象の核酸断片試料としては通常、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いる。試料核酸断片は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料

がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、末梢血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応によりcDNAとすることが好ましい。1回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量としては、測定条件によって異なるが、数 $\mu$ g以下を用いることが好ましい。核酸チップ上の核酸断片がオリゴDNAである場合には、試料核酸断片は低分子化しておくことが望ましい。

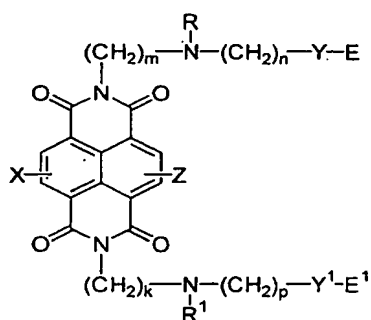
【0041】[標識付きインターカレータ] 標識付きインターカレータとしては、該インターカレータが二本鎖核酸断片に取り込まれた後、そのインターカレータの標識量を測定できるものであれば、何れの標識が付されたものであってもよいが、標識は、導電性標識もしくは蛍光標識であることがさらに好ましく、導電性標識であることが特に好ましい。

【0042】導電性標識付きインターカレータ（すなわち、導電性インターカレータ）としては、特開平9-288080号公報、特願平11-159339号の明細書および文献（J. Chem. Soc. Commun., 1111(1998)）に記載のインターカレータを用いることができる。導電性インターカレータとしては、特に、下記一般式（I）及び一般式（II）で表されるものが好ましく用いることができる。一般式（I）で表されるインターカレータは、印加電圧が400乃至600mVの範囲にピーク電流値を有する特徴を持つ。

【0043】

【化1】

(I)



【0044】上記式中、N-置換-イミノ基は、縫い込み型インターカレータに可溶性を付与する基であり、RおよびR<sub>1</sub>は、互いに独立に、水素原子、そして、置換基を有していてもよい炭素原子数が1乃至3のアルキル

基、炭素原子数が2乃至4のアシル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基および炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表す。炭素原子数が1乃至3のアルキル基としては、メチル基もしくはエチル基であることが好ましく、メチル基であることが特に好ましい。炭素原子数が2乃至4のアシル基としては、アセチル基であることが好ましい。炭素原子数が6乃至20のアリール基としては、フェニル基もしくはナフチル基であることが好ましく、フェニル基であることが特に好ましい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基としては、ベンジル基であることが好ましい。RおよびR<sub>1</sub>は、同一の原子もしくは基であることが好ましく、メチル基であることが特に好ましい。

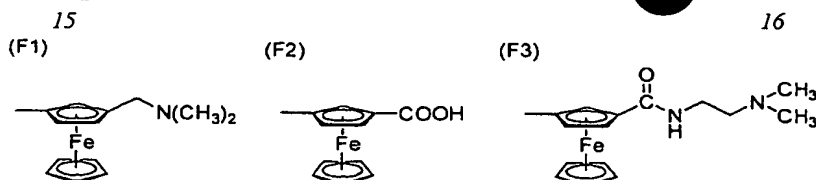
【0045】置換基としては、ヒドロキシル基、ハロゲン原子（F、Cl、Br等）、カルボキシル基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が1乃至6のアルキルアミノ基、炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基、炭素原子数が6乃至12のアリール基、および炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基からなる群より選ばれる原子もしくは基を挙げることができる。置換基の数は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が1乃至6のアルキルアミノ基、炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基については、1乃至12個であることが好ましく、1乃至3個であることがさらに好ましく、1個であることが特に好ましい。炭素原子数が6乃至12のアリール基については、その数は1乃至7個であることが好ましく、1乃至3個であることがさらに好ましく、1個であることが特に好ましい。

【0046】YおよびY<sub>1</sub>は、互いに独立に、-NH-CO-基もしくは-CO-NH-基を表し、-NH-CO-基であることが好ましい。これらの基のカルボニル基もしくはイミノ基が、それぞれ、EおよびE<sub>1</sub>と結合する。

【0047】EおよびE<sub>1</sub>は、互いに独立に、一つの結合手を有するフェロセンを表す。当該フェロセンは、置換基を有していても有していなくてもよい。置換基を有している場合には、同一であることが好ましい。以下に、置換基を有するフェロセンの具体例を示す。置換基の位置は、シクロペンタジエニル基の何れの位置であってもよい。

【0048】

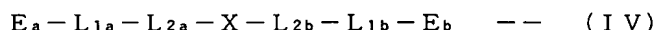
【化2】



【0049】XおよびZは、互いに独立に、水素原子、ハロゲン原子、あるいは炭素原子数1乃至6のアルキル基を表すが、水素原子であることが好ましい。炭素原子数1乃至6のアルキル基の好ましい例としては、前記記載のR（もしくはR<sub>1</sub>）と同様である。

【0050】m、n、kおよびpは、縫い込み型インターカレータのリンカー部分の長さを決定するものであり、各々、1乃至6の整数を表す。但し、mとnとの和、およびkとpとの和は、各々、4乃至8である。mとk、およびnとpとは、それぞれ、同一の数であることが好ましく、m、n、kおよびpは、何れも3であることが特に好ましい。

【0051】上述の導電性標識付きインターカレータ \*



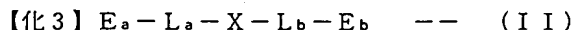
【0056】式（II）と式（IV）において、Xは、置換基を有していてもよい二価の環状基を表す。二価の環状基としては、平面性を有する環状基であることが好ましく、二つの窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基、2位と6位、もしくは1位と5位（好ましくは2位と6位）とに結合手を有するアントラセン基、アントラセン基と同じ位置に結合手を有するアントラキノ基、2位と6位とに結合手を有するフルオレン基、2位と6位とに結合手を有するピフェニレン基、2位と7位とに結合手を有するフェナントレン基、および2位と7位とに結合手を有するピレン基からなる群より選ばれる環状基であることが好ましく、二つの窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基であることが特に好ましい。置換基としては、水素原子、ハロゲン原子（F、Cl、Br等）、あるいは炭素原子数1乃至6のアルキル基であることが好ましいが、水素原子であることが好ましい。炭素原子数1乃至6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、もしくはn-プロピル基であることが好ましい。

【0057】前記式において、L<sub>a</sub>およびL<sub>b</sub>は、互いに独立に、それぞれがE<sub>a</sub>およびE<sub>b</sub>の共役系が延長される共役系を形成することのない連結基であって、少なくとも一方の連結基が、本化合物に水溶性を付与する部位を有する連結基もしくは水溶性を付与する部位に変換し得る部位を有する連結基である。ここで、「水溶性を付与する部位に変換し得る部位」とは、たとえば、メチル基を置換基として有するイミノ基のように、硫酸などの酸と接触した場合に、硫酸塩部位に変換され、水溶性を示すように変化する部位を有する。勿論、「本化合物に水溶性を付与する部位」に塩部分のような荷電部分を持つ

\*は、例えば、特開平9-288080号公報に記載の方法によって簡便に収率良く製造することができる。

【0052】次に、一般式（II）で表される導電性インターカレータを示す。この導電性インターカレータは、印加電圧100乃至400mVの範囲にピーク電流値を有する性質を持つ。

【0053】



【0054】上記の導電性縫い込み型インターカレータとして特に有利に用いられる化合物は、下記式（IV）で表わされる化合物である。

【0055】

【化4】

ていてもよい。

【0058】L<sub>a</sub>およびL<sub>b</sub>は、互いに独立に、E<sub>a</sub>およびE<sub>b</sub>に隣接する側に、置換基を有していてもよい炭化水素基（前記式のL<sub>1a</sub>とL<sub>1b</sub>に相当する基）を有し、一方、Xに隣接する側に炭素元素以外の元素を含む連結基（前記式のL<sub>2a</sub>とL<sub>2b</sub>に相当する基）とからなる連結基であることが好ましい。従って、L<sub>a</sub>およびL<sub>b</sub>は、それぞれ、前記式の-L<sub>1a</sub>-L<sub>2a</sub>-,そして-L<sub>2b</sub>-L<sub>1b</sub>-に該当する連結基であることが望ましい。ここで、L<sub>1a</sub>とL<sub>1b</sub>は、互いに独立に、置換基を有していてもよい炭素原子数が1乃至6のアルキレン基あるいは置換基を有していてもよい炭素原子数が2乃至6のアルケニレン基であることが好ましく、一方、L<sub>2a</sub>とL<sub>2b</sub>とは、互いに独立に、N、O、もしくはSを含む連結基であることが望ましい。

【0059】L<sub>1a</sub>およびL<sub>1b</sub>の置換基としては、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、カルボキシル基、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、ホルミル基、ホルミルアミノ基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が1乃至6のアルキルアミノ基、炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基、炭素原子数が5乃至7のシクロアルキルアミノ基、炭素原子数が2乃至12のジアルキルアミノ基、炭素原子数が6乃至12のアリール基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至18のアラルキル基、1乃至6のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至18のアラルキルアミノ基、炭素原子数が2乃至7のアルカノイル基、炭素原子数が2乃至7のアルカノイルアミノ基、炭素原子数が3乃至10のN-アルカノイル-N-アルキルアミノ基、アミノカルボニル基、炭素原子数が2乃至7のアルコキシカルボニ

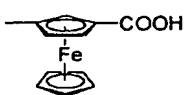
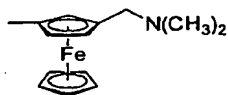
ル基、S、NおよびOからなる群より選ばれるヘテロ原子を1乃至4個含む炭素原子数2乃至10の複素環基、並びに置換基として炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数1乃至6のアルコキシ基、もしくはハロゲン原子を1乃至5個有していてもよい環構成炭素原子数の数が6乃至12のアリール基からなる群より選ばれる原子もしくは基である。置換基の数は、炭素原子数が1乃至6のアルキレン基では、1乃至12個であることが好ましく、1乃至3個であることが特に好ましい。炭素原子数が1乃至6のアルケニレン基については、その数は1乃至10個であることが好ましく、1乃至3個であることが特に好ましい。

【0060】L<sub>2a</sub>とL<sub>2b</sub>とは、互いに独立に、それぞれ、置換基を有していてもよい、アミド結合基、エステル結合基、エーテル結合基、チオエーテル結合基、ジイミド結合基、チオジイミド結合基、チオアミド結合基、イミノ結合基、カルボニル結合基、チオカルボニル結合基および1, 4-ピペラジニル基からなる群より選ばれる基を一個もしくは複数個含む連結基であることが好ましく、特に好ましいのはアミド基(—NHCO—基、もしくは—CONH—基)である。

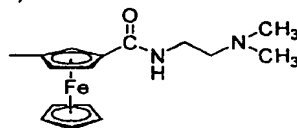
【0061】L<sub>2a</sub>とL<sub>2b</sub>の置換基の例としては、炭素原子数が1乃至3のアルキル基、炭素原子数が2乃至4のアシル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基および炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基からなる群より選ばれる基で置換されていてもよい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基としては、メチル基もしくはエチル基であることが好ましく、メチル基であることが特に好ましい。炭素\*

(F1)

(F2)



(F3)



【0065】前記式(I I)及び(I V)の縫い込み型インターカレータとして有利に用いることのできる化合物は、例えば、公知のジアミン化合物を原料として、公知の方法(特開平9-288080号公報)に準じる製造方法によって簡便に製造することができる。

【0066】次に、蛍光標識付きインターカレータ(以下、「蛍光インターカレータ」という)について説明する。蛍光インターカレータは、水溶性縫い込み型蛍光インターカレータであって、その一般式(V)および(V I)を下記に示す。下記式で表される蛍光インターカレータは蛍光性基(F)を有する。

【0067】

【化6】F — L<sub>a</sub> — X — — — (V)F — L<sub>a</sub> — X — L<sub>b</sub> — Z — — — (V I)

【0068】[但し、Fは蛍光性基、Xは環状基、そし

\*原子数が2乃至4のアシル基としては、アセチル基であることが好ましい。炭素原子数が6乃至20のアリール基としては、フェニル基もしくはナフチル基であることが好ましく、フェニル基であることが特に好ましい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基としては、ベンジル基であることが好ましい。

【0062】L<sub>2a</sub>とL<sub>2b</sub>がイミノ結合基である場合、その置換基としては、メチル基であることが特に好ましい。従って、L<sub>2a</sub>とL<sub>2b</sub>は、それぞれ独立に、N-メチル—ジ(n-プロピレニル)イミノ基、1, 4-ジ(n-プロピレニル)-ピペラジニル基であることがさらに好ましく、N-メチル—ジ(n-プロピレニル)イミノ基であることが特に好ましい。

【0063】E<sub>a</sub>およびE<sub>b</sub>は、酸化還元活性を有し、これによって導電性を付与する基であり、互いに独立に、置換基を有していてもよい、一つ以上の結合手を持つメタロセン、2, 2'-ビピリジン錯体、シクロブタジエン錯体、シクロペンタジエニル錯体、1, 10-フェナントロリン錯体、トリフェニルホスフィン錯体、カテコールアミン、あるいはビオローゲンなどであることが好ましい。置換基を有していてもよい一つの結合手を持つフェロセンであることが特に好ましい。E<sub>a</sub>およびE<sub>b</sub>は互いに同一の基であることが好ましい。次に、置換基を有するフェロセンの具体例を示す。置換基の位置は、シクロペンタジエニル基の何れの位置であってもよい。

【0064】

【化5】

てL<sub>a</sub>は連結基であって、少なくともXとL<sub>a</sub>のいずれかは、該インターカレータに、水溶性を付与できるか、あるいは水溶性を付与できる基に変換し得る部位を有する。なお、Zは非蛍光性基、そしてL<sub>b</sub>は連結基である]。

40

【0069】上記式中、Xは、本発明の蛍光インターカレータのコア部分であり、置換基を有していてもよい一価もしくは二価の環状基を表す。環状基としては、平面性を有する環状基であることが好ましく、窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基、2位、6位、1位もしくは5位(好ましくは、2位もしくは6位)に結合手を有するアントラセン基、アントラセン基と同じ位置に結合手を有するアントラキノ基、2位もしくは6位に結合手を有するフルオレン基、2位もしくは6位に結合手を有するビフェニレン基、2位もしくは7位に結

50

19

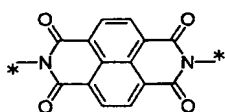
合手を有するフェナントレン基、および2位もしくは7位に結合手を有するピレン基からなる群より選ばれる環状基であることが好ましく、二つの窒素原子に結合手を有するナフタレンジイミド基であることが特に好ましい。置換基としては、ハロゲン原子(F、Cl、Br、I等)、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル基であることが好ましいが、水素原子であることが好ましい。炭素原子数が1乃至6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、もしくはn-プロピル基であることが好ましい。

【0070】Xの具体例を下記に示す。\*印は、結合手の位置を示す。

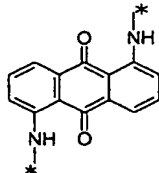
【0071】

【化7】

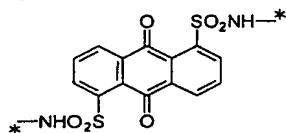
(X1)



(X2)



(X3)

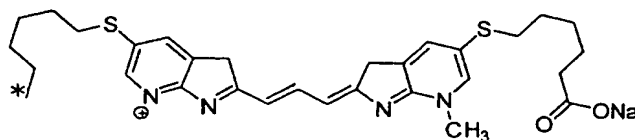


【0072】Fは、蛍光性基（一つの結合手を有する蛍光発生基）を表す。蛍光発生基は、特定の波長、例えば、波長が400乃至700nmの範囲（好ましくは、400乃至550nmの範囲）にある励起光の照射によって蛍光を発する基であることが好ましい。このような蛍光発生基となる化合物としては、インドシアニン系化合物、アザインドレニンシアニン系化合物、アクリジン系化合物、および溝結合型化合物（groove binder）を挙げることができる。ここで、溝結合型化合物とは、一般的に、その分子内に四級カチオン性基を有し、そのカ

(F3)

【0077】

【化11】



20

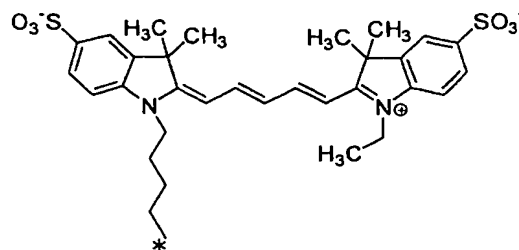
チオン性基の存在によって、二本鎖核酸断片のリン酸エステル基のアニオンと強く相互作用する化合物をいう。溝結合型化合物は、そのコア部分(X)と蛍光性基(F)とが塩基対を介して積層した状態で二本鎖核酸断片に結合する。なお、「結合」とは、一定の速度で、蛍光インターカレータの二本鎖核酸断片の塩基対間への挿入、および塩基対間からの離脱が繰り返されている状態をいう。

【0073】下記に、インドシアニン系化合物、アザインドレニンシアニン系化合物、アクリジン系化合物、および溝結合型化合物の具体例をこの順に、一つの結合手を有する構造として示す。結合手の位置を\*印で示す。

【0074】

【化8】

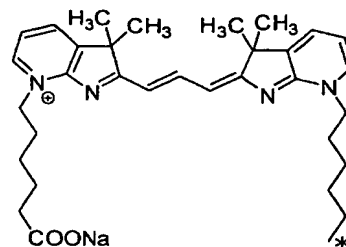
(F1)



【0075】

【化9】

(F2)

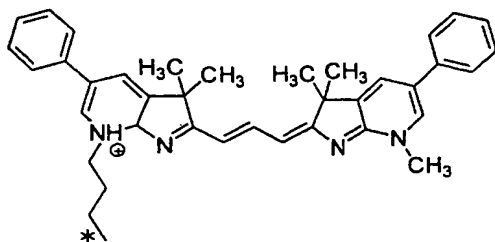


【0076】

【化10】

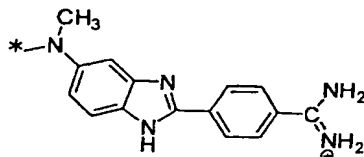
21

(F4)



【0078】

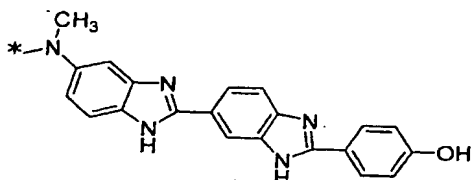
(F7)



【0080】

【化14】

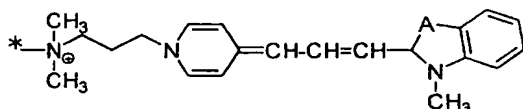
(F9)



【0081】

【化15】

(F10)

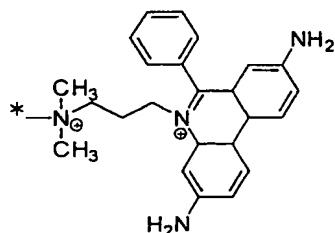


【0082】上記式中、Aは、酸素原子あるいはイオウ原子を示す。

【0083】

【化16】

(F11)

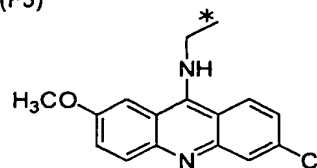


【0084】L aおよびL bは、互いに独立に、蛍光インターカレタに可溶性を付与する基を含む二価の連結基であることが好ましく、その直鎖部分が炭素原子数が3乃至10の炭化水素基に相当する長さを有する基を持

\* 10

\* 【化12】

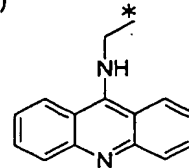
(F5)



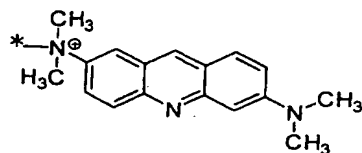
【0079】

【化13】

(F6)



(F8)



つことが好ましい。ここで、直鎖部分とは、L aに関しては、その一方の端部がコア部分(X)と縮合し、かつ他方の端部がFと縮合する部分、L bに関しては、その一方の端部がコア部分(X)と縮合し、かつ他方の端部がZと縮合する部分をいう。L aとL bは、蛍光インターカレタの調製の都合上、互いに同一の基であることが好ましい。なお、L aは、二価の連結基中に、アルキレン基と窒素原子を有する二価の基とを含む連結基であることがさらに好ましい。窒素原子を有する二価の基は、L aの直鎖部分に含むことが好ましい。窒素原子を有する二価の基としては、イミノ基、1, 4-ピペラジニル基、1, 3-イミダゾリジニル基、ピロリジニル基、二価のピラゾリジニル基、あるいは二価のビペリジニル基であることが好ましく、イミノ基、あるいは1, 4-ピペラジニル基であることが特に好ましい。

【0085】窒素原子は、炭素原子数が1乃至3のアルキル基、炭素原子数が2乃至4のアシル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基および炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基からなる群より選ばれる基で置換されていてもよい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基としては、メチル基もしくはエチル基であることが好ましく、メチル基であることが特に好ましい。炭素原子数が2乃至4のアシル基としては、アセチル基であることが好ましい。炭素原子数が6乃至20のアリール基としては、フェニル基もしくはナフチル基であることが好ましく、フェニル基であることが特に好ましい。炭素原子数が1乃至3のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至23のアラルキル基としては、ベンジル基であることが好ましい。イミノ基の置換基としては、メチル基であることが特に好ましい。従って、L a (もしくはL b) は、N-メチル-ジ(n-プロピレニル)イミノ基、1, 4-ジ(n-プロピレニル)-ピペラジニル基であることがさらに好ましく、N-メチル-ジ(n-プロピレニル)イミノ基で

あることが特に好ましい。

【0086】LaおよびLbは、イミノ基、チオエーテル基、カルボニルオキシ基、チオカルボニルオキシ基もしくはカルボニル基を含むことがより好ましく、イミノ基、チオエーテル基もしくはカルボニル基を含むことがさらに好ましく、イミノ基を含むことが特に好ましい。

【0087】Zは、非蛍光性基を表し、アミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基、スルフィン酸基、スルフェン酸基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、水酸基、イミノ基およびメルカプト基からなる群より選ばれる基であることが好ましく、アミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基あるいはメルカプト基であることがより好ましく、アミノ基であることが特に好ましい。

【0088】上記の蛍光インターカレータは、一般的に水性溶媒条件下で用いられるため、水溶性であることが必要とされる。インターカレータに水溶性を付与するためには、前記記載のように、X、LaあるいはLbに可溶性を付与する基を含めることも好ましいが、インターカレータの塩として用いてもよい。塩としては、塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、リン酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩等の無機塩との酸付加塩、あるいは酢酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩等の有機酸との付加塩、またはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等の無機塩類、あるいはピリジン塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩、エタノールアミン塩等の有機塩類を挙げることができる。

【0089】上記の蛍光インターカレータは、公知の方法（特開平9-288080号公報に記載の方法）と類似の製法を利用して簡便に製造することができる。この方法では、蛍光性基が二つ導入されたものも得られるが、反応条件を変えて、あるいは反応生成物の分離精製を行って本発明の蛍光インターカレータのみを得ることができる。

【0090】上記の蛍光インターカレータの他にも、文献（Bull.Chem.Soc.Jpn.,72,327-337(1999)）に記載の蛍光インターカレータも好ましく用いることができる。

【0091】[ハイブリダイゼーション] ハイブリダイゼーションは、水系媒体の物理的もしくは化学的な環境因子を連続的に変化させながら、水系媒体と標識付きインターカレータの存在下にて実施する。水系媒体の因子を変化させる開始時点は、二本鎖が解離する方向に該環境因子を働かせる場合には、二本鎖形成後、二本鎖を形成させる方向に該環境因子を働かせる場合には、反応開始時であることがそれぞれ好ましい。標識付きインターカレータは、10nM乃至10mMの濃度範囲にて用いることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして0.5乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション

終了後、界面活性剤（好ましくは、ドデシル硫酸ナトリウム）と緩衝液（好ましくは、クエン酸緩衝液）との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。

【0092】[固相担体上の標識量の検出] 二本鎖の結合状態は、二本鎖核酸断片に取り込まれた標識付きインターカレータの量を測定することによって検出できる。即ち、インターカレータの標識に由来する信号である、酸化還元電流、蛍光強度、発光、消光、蛍光偏光等をそれぞれの信号に対応した測定装置を用いて測定することにより、取り込まれているインターカレータを定量することができる。酸化還元電流の測定は、サイクリックボルタモグラフィー、デファレンシャルパルスボルタモグラフィー、ポテンシostat、リニアスイープボルタモグラフィー等によって行うことが好ましく、蛍光強度の測定には、蛍光レーザースキャナー法や冷却CCD（電荷結合素子）法によって行なうことが好ましい。

【0093】本発明の検定方法で得られた標識量の評価方法は、一つに限定されるものではないが、下記に例を挙げる。試料核酸断片とのハイブリダイズを行わず、核酸チップに標識付きインターカレータを接触させる条件下での標識量（バックグラウンド値）を予め求めておき、本発明の検定方法で得られた標識量と前者との差を補正標識量とする。さらに、前述した検定方法の工程（A）および工程（B）の初期段階でそれぞれ得られる各補正標識量を互いに調整して、真の標識量として評価する。つまり、例えば、水系媒体の因子の影響がなくても、あるいはほとんど影響がない段階でも、完全な二本鎖核酸断片に取り込まれる標識量と、部分相補的な二本鎖核酸断片に取り込まれる標識量とは異なるため、この差を調整する必要がある。

【0094】

【実施例】[実施例1]

（1）核酸チップの作製

面積が2mm<sup>2</sup>の金電極を2N水酸化ナトリウム水溶液中に1時間浸漬し、次いで超純水で洗浄後、濃硝酸に浸して、15分間攪拌した。この金電極を超純水で洗浄後、金電極表面に、アデニンの20量体の5'末端にメルカプトヘキシル基を結合させたオリゴヌクレオチド（HS-dA<sub>20</sub>）の水溶液1.0μL（10ピコモル/μL）を点着し、2時間放置後、超純水で洗浄して、該dA<sub>20</sub>がプローブ分子として表面に結合している核酸チップを作製した。なお、dA<sub>20</sub>およびHS-dA<sub>20</sub>の調製は、特開平9-288080号公報および文献（B.A. Connolly, Nucleic Acids Res., 13, 4484(1985)）の記載の方法に従って行った。

【0095】（2）電極のマスキ処理

核酸チップの表面に、2-メルカプトエタノールの水溶液1μL（1mM）を滴下し、次いで該チップにキャップをして2時間放置し、超純水で洗浄した。

## (3) 参照DNA断片の調製

参照用のDNA断片 d T<sub>20</sub>は、特開平9-288080号公報に記載の方法に従って合成した。

## (4) プローブ分子と参照DNA断片とのハイブリダイゼーション

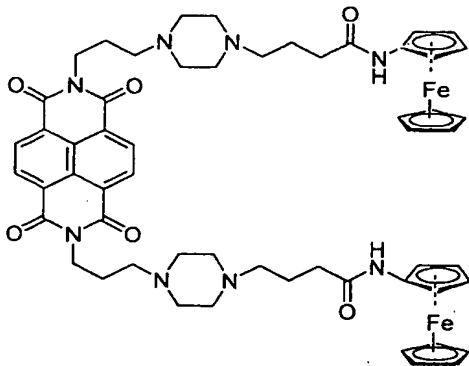
上記(3)の参照DNA断片 d T<sub>20</sub>の水溶液 1 μL (20ピコモル/μL)を核酸チップ表面に点着し、20℃で30分間放置した。

## 【0096】(5) 標識量の測定

恒温セルを用いて、温度を15乃至45℃の範囲で変化させながら、下記式で表される導電性標識付きインターカレータ (50 μM)を含む電解質溶液 (0.1 M 酢酸/酢酸カリウム水溶液 (pH 5.6) - 0.1 M 塩化カリウム水溶液の混合液) 中に、上記(4)で得られたハイブリダイゼーション後のチップ (作用極)、白金 (対極)、および銀/塩化銀参照電極を浸して三電極を形成させ、各温度でのデファレンシャルボルタモグラフを測定し、460 mVにおけるピーク電流値を求めた (図3の—△—)。図3には、温度の変化に対するピーク電流値の関係を示す。なお、20℃におけるピーク電流値は、参照DNA断片を存在させない以外は上記と同様の操作を行なって得られるピーク電流値と比べ、37.3%変化していた。

## 【0097】

## 【化17】



【0098】次に、d T<sub>8</sub> d A<sub>4</sub> d T<sub>8</sub> (部分相補性DNA断片)を試料DNA断片として用いる以外は上記と同様にして、460 mVにおけるピーク電流値を求めた (図3の—○—)。なお、20℃におけるピーク電流値は、試料DNA断片を存在させない以外は同様の操作を行って得られるピーク電流値と比べ、15.1%変化していた。

【0099】図3より、二本鎖核酸断片が完全相補性である場合 (d A<sub>20</sub>-d T<sub>20</sub>) には、ピーク電流値が、30乃至40℃の温度範囲で急激に変化しているのに対し、二本鎖核酸断片が部分相補性である場合 (d A<sub>20</sub>-d T<sub>8</sub> d A<sub>4</sub> d T<sub>8</sub>) には、より低い20乃至30℃の温度範囲で急激に変化していることが分かる。この挙動の差によって、二本鎖核酸断片の結合状態が部分相補的で

あるか否か、即ち、試料核酸断片が、プローブ分子 (d T<sub>20</sub>) について、塩基配列において部分的に同一性を有する核酸断片であることを検出することができる。

## 【0100】【実施例2】

## (1) 核酸チップの作製

面積が2.25 mm<sup>2</sup>の金電極を2 N 水酸化ナトリウム水溶液中に1時間浸漬し、次いで超純水で洗浄後、濃硝酸に浸して、15分間攪拌した。この金電極を超純水で洗浄後、金電極表面に、アデニンの20量体の5'末端にメルカプトヘキシル基を結合させたオリゴヌクレオチド (H S-d A<sub>20</sub>) の水溶液 2.0 μL (100ピコモル/μL)を点着し、1時間放置した後、超純水で洗浄して、該 d A<sub>20</sub>がプローブ分子として表面に結合している核酸チップを作製した。滴下した水溶液中の H S-d A<sub>20</sub>の濃度変化を HPLCを用いて測定し、この値から電極表面に固定された H S-d A<sub>20</sub>の量を計算した結果、固定量は20ピコモルであった。

## 【0101】(2) 電極のマスク処理

核酸チップの表面に、2-メルカプトエタノールの水溶液 1 μL (1 mM)を滴下し、次いで該チップにキャップをして2時間放置し、超純水で洗浄した。

## (3) 参照DNA断片および試料DNA断片

参照DNA断片 (d T<sub>20</sub>)と試料DNA断片 (d T<sub>9</sub> d A<sub>1</sub> d T<sub>10</sub>: 部分相補性)とを用意した。

## (4) プローブ分子とDNA断片とのハイブリダイゼーション

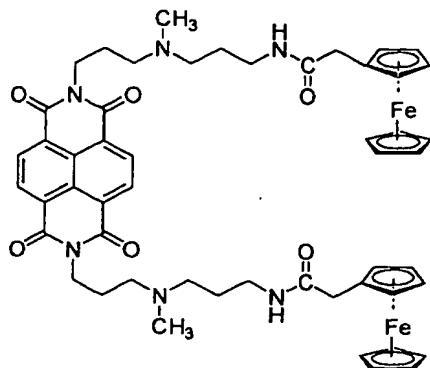
上記の参照DNA断片 (d T<sub>20</sub>) 及び試料DNA断片 (d T<sub>9</sub> d A<sub>1</sub> d T<sub>10</sub>) のいずれかを含む水溶液 2 μL (70ピコモル/μL: 10 mM トリスバッファー、pH 7.5)を上記の核酸チップ表面に点着し、点着水溶液が蒸発しないようにカバーして、25℃で20分間インキュベートした。インキュベート終了後、電極表面を0.1 M リン酸二水素ナトリウム/リン酸水素二ナトリウム水溶液 (pH 7.0)を用いて洗浄し、未固定の核酸断片を除去した。

## 【0102】(5) 標識量の測定

恒温セルを用いて、温度を5乃至45℃の範囲で10℃ずつ変化させながら、下記式で表される導電性標識付きインターカレータ (50 μM)を含む電解質溶液 (0.1 M 酢酸/酢酸カリウム水溶液、pH 5.6) 中に、上記(4)で得られたハイブリダイゼーション後のチップ (作用極)、白金 (対極)、および銀/塩化銀参照電極を浸して三電極を形成させ、各温度でのデファレンシャルボルタモグラフィ (DPV) を測定した。測定は、パルス振幅 50 mV、パルス幅 50 mS、スキャン速度 100 mV/秒にて実施した。

## 【0103】

## 【化18】



【0104】各温度におけるDPV測定の影響ピーク電流値を測定した結果、フルマッチ構造 ( $dA_{20}/dT_{20}$ ) をとる参照核酸断片の場合には、影響ピーク電流が35～45℃の間で急激に変化(低下)したのに対して、ミスマッチ構造 ( $dA_{20}/dT_9dA_1dT_{10}$ ) をとる試料核酸断片の場合には、影響ピーク電流は25～35℃の間で急激に変化(低下)した。従って、この変化温度の差を検出することによって、試料核酸断片の相補性を検定することができる。

#### 【0105】[実施例3]

(1) 核酸チップの作製乃至(4)ハイブリダイゼーション

実施例2と同様に行なった。

#### 【0106】(5) 標識量の測定

25℃恒温セルを用いて、導電性標識付きインターカレータ(実施例2で使用したものと同一化合物、50μM)を含む電解質溶液(0.1M酢酸/酢酸カリウム水溶液、pH5.6)中に、ハイブリダイゼーション後のチップ(作用極、負極)、白金(対極、正極)、および銀/塩化銀参照電極を浸して三電極を形成させた。負極と正極との間での電気的勾配(電位)を、0.0Vから1.6Vまで、0.2Vずつ変化させ、その都度、デファレンシャルパルスボルンメトリー測定(DPV)を行なった。この測定は、パルス振幅50mV、パルス幅50mS、スキャン速度100mV/秒にて実施した。

【0107】各電気的勾配の設定後、DPB測定で得られる影響ピーク電流値を測定したところ、フルマッチ構造 ( $dA_{20}/dT_{20}$ ) の参照核酸断片の場合では、電気的勾配を1.2Vに設定したのちに影響ピーク電流が急激に変化(低下)したのに対して、ミスマッチ構造 ( $dA_{20}/dT_9dA_1dT_{10}$ ) をとる試料核酸断片の場合には、影響ピーク電流は電気的勾配0.8Vにて急激に変化(低下)した。従って、この電気的勾配値の差を検出することによって、試料核酸断片の相補性を検定することができる。

#### 【0108】[実施例4]

(1) 核酸チップの作製乃至(4)ハイブリダイゼーション

実施例2と同様に行なった。

#### 【0109】(5) 標識量の測定

25℃恒温セルを用いて、導電性標識付きインターカレータ(実施例2で使用したものと同一化合物、50μM)を含む電解質溶液(0.1M酢酸/塩化カリウム水溶液、pH5.6)中に、ハイブリダイゼーション後のチップ(作用極、負極)、白金(対極、正極)、および銀/塩化銀参照電極を浸して三電極を形成させた。この電解質溶液の塩化カリウム濃度を0.6Mから0.0Mまで0.1Mずつ変化させ、その都度、デファレンシャルパルスボルンメトリー測定(DPV)を行なった。この測定は、パルス振幅50mV、パルス幅50mS、スキャン速度100mV/秒にて実施した。

【0110】各イオン強度(塩化カリウムの濃度)の設定後、DPB測定で得られる影響ピーク電流値を測定したところ、フルマッチ構造 ( $dA_{20}/dT_{20}$ ) の参照核酸断片の場合では、塩化カリウムの濃度が0.1～0.0Mの間で、影響ピーク電流が急激に変化(低下)したのに対して、ミスマッチ構造 ( $dA_{20}/dT_9dA_1dT_{10}$ ) をとる試料核酸断片の場合には、影響ピーク電流は、塩化カリウムの濃度が0.2～0.1Mの間で急激に変化(低下)した。従って、この塩化カリウム濃度(イオン強度)の差を検出することによって、試料核酸断片の相補性を検定することができる。

#### 【0111】

【発明の効果】本発明の核酸断片の相補性の検定方法では、核酸チップに固定されたプローブ分子に対する試料核酸断片の相補性を、水系媒体の物理的もしくは化学的な環境因子を変化させることによって検定することが可能となる。従って、本発明の方法は、試料中の塩基置換を伴う異常遺伝子を検定するのに有効な方法である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】ハイブリダイゼーションの条件によって二本鎖構造あるいは一本鎖構造をとる様子を示す模式図である。

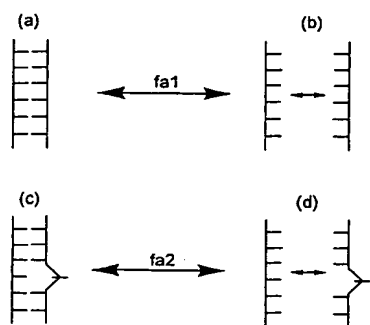
【図2】本発明の塩基配列の相補性を検定する方法(1)の工程(A)及び工程(B)を示す模式図である。

【図3】水系媒体の環境因子の変化として温度変化を利用することにより、塩基配列の相補性を検定することが可能であることを示すグラフ(実施例1で得られたグラフ)である。

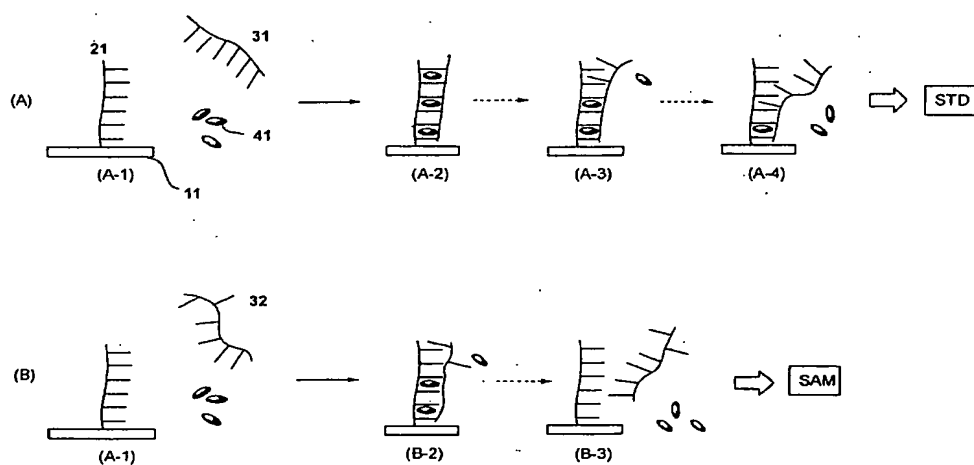
#### 【符号の説明】

- 11 基板
- 21 核酸断片
- 31 参照遊離核酸断片
- 32 試料遊離核酸断片
- 41 標識付きインターカレータ

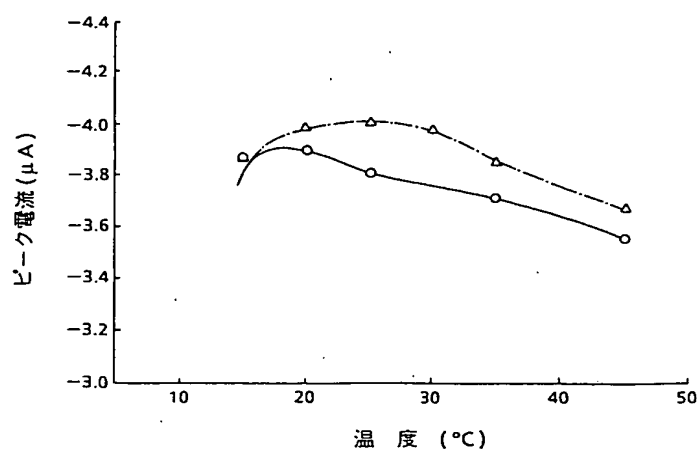
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マコ-ト\*(参考)

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/566

33/532

33/58

A

33/566

37/00

1 0 1

33/58

1 0 2

37/00

1 0 1

C 1 2 M 1/00

A

1 0 2

C 1 2 N 15/00

A

// C 1 2 M 1/00

F

G 0 1 N 27/30

3 5 1

(72)発明者 小川 雅司

東京都港区西麻布2丁目26番30号 富士写

真フィルム株式会社内

(72)発明者 竹中 繁織

福岡県古賀市舞の里4-23-21

(72)発明者 高木 誠

福岡県福岡市博多区昭南町3-4-29

(72)発明者 山下 健一

福岡県福岡市城南区堤団地17-104